

## [3]

氏 名 (本籍地)	清水 史子 (神奈川県)
学 位 の 種 類	博士 (学術)
学 位 記 番 号	博甲第 35 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 8 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
論 文 題 目	<b>カロテノイドの体内動態に関する研究 ～<math>\beta</math>-カロテンとリコペンの相互動態に関する検討～</b>
論文審査委員	(主査) 昭和女子大学教授 島田 淳子 (副査) 昭和女子大学教授 芦川 智 昭和女子大学教授 飯野 久和 昭和女子大学教授 木村 修一 お茶の水女子大学名誉教授 福場 博保

## 論 文 要 旨

$\beta$ -カロテン (以下BC) はプロビタミンA作用に加え、一重項酸素の消去剤として、ガンや動脈硬化予防に関わることが知られている。リコペン (以下LYC) は非プロビタミンAだが、一重項酸素消去能はBCの 2 倍以上であることから、近年それ自身の作用に期待が集まっている。ヒトはこれらカロテノイドを緑黄色野菜などの食品から摂取し体内に取り込むが、摂取後の体内動態、特にBCとLYCの相互動態に関する研究はほとんど行われていない。その理由は、実験動物として通常用いられるラットはBC中央開裂酵素 ( $\beta$ -carotene-15, 15'-dioxygenase, EC 1.13.11.21) 活性が高く、摂取したBCを速やかにレチノール (以下RT) に転換させるため、ヒトとカロテノイド代謝が異なるからである。

そこで、本研究は、カロテノイドの体内動態を明らかにするため、BC投与による生体への影響をLYC及びRTとの関連に着目し検討した。

本論文は、序論、第 1 ～ 3 章より構成されている。序論では本研究の背景と、意義・目的について述べた。

第 1 章では、ヒトを対象にBC投与による生体への影響を検討した。まず、BC源として、LYCを含有していないニンジンジュースを14日間飲用したところ、飲用終了直後の血清及び糞便中のBC、LYCともに飲用前と比較して有意な上昇が観察された。特に血清及び糞便中LYCの増加は、ニンジンジュース中にはLYCが含まれていないことから、ニンジンジュース中のBCによる影響であると示唆された。しかし、本実験は日常生活を継続しての実施であったことから、食事由来のLYCが血清及び糞便中濃度に影響したと推測された。そこで、BC投与によるBCとLYCの体内蓄積及び排泄の関係を明確にするため、食事由来LYCの影響を避け、LYCフリー食下7日間のニンジンジュース飲用によりBCを投与したところ、血清中BCは前実験同様有意に増加した。また、血清中LYCは摂取LYCを制限しているため減

少ししたが、糞便中LYCは、摂取LYCを制限しているにも拘わらず、BCを投与することで排泄量が有意に増加した。以上の結果より、BC投与による血清中BCの増加と排泄LYCの増加に何らかの相互作用があることが推測された。その理由として仮説①生体内でLYCが生成され糞便中に排泄された、仮説②プロビタミンA活性を有するBCを優先的に体内に取り込もうとする働きにより、体内に蓄積されたLYCが糞便中に排泄された、という2点が考えられた。そこで、仮説①の可能性を明らかにするため、大腸内に棲息する腸内細菌による影響を検討した。健康成人女子の新鮮便に、BCを添加し37℃、嫌気下で0～24時間静置培養したところ、培養便中のLYC量は時間の経過に伴い増加傾向を示した。さらに培養後のBC量に対するLYC量の割合を求めたところ、0時間と比較して24時間後で有意に増加していることから、糞便中のLYCの増加に腸内細菌が関与することが示唆された。

次に第2章では、血液や排泄物のみならず、カロテノイド及びRTの体内動態を包括的に検討するため、ヒトのカロテノイド吸収・代謝モデルとなる実験動物の検討を行った。まず、スナネズミ (*Meriones unguiculatus*) とラットの小腸を用い、*in vitro*系でBC吸収の比較をしたところ、BCの取り込み、RTの生成どちらもスナネズミが有意に多かった。そこで、次にスナネズミにBC及びLYCを28日間投与し、それらの体内動態を検討したところ、BC投与群では、肝臓、血漿、糞便中にBCが検出された。さらに糞便中にわずかながらLYCが検出され、第1章のヒトに対するBC投与実験と同様の結果を得た。LYC投与群では、肝臓、血漿ともにLYCの蓄積が確認され、スナネズミはヒトとカロテノイド吸収・代謝が類似することが明らかとなった。また、カロテノイドを投与していない対照群と比較して、BC群、LYC群ともに、肝臓中のRT量が低い値を示し、RT蓄積とカロテノイド投与間に競合などの相互作用があることが示唆された。次に、前実験でカロテノイド吸収・代謝モデルとして有用であることが明らかとなったスナネズミを用いて、第1章仮説②として考えられる、BC投与による体内蓄積LYCの体外排泄を検討したところ、わずかながらLYCの糞便排泄が見られ、肝臓蓄積LYCが胆汁排泄とともに腸管へ排泄されていると示唆された。さらにBCとLYCを同時投与すると、単独投与と比較して、それぞれの肝臓蓄積が抑制することが観察された。

第3章では、これまでの研究結果を総合総括した。すなわち、ヒト及びスナネズミにおいて、BC投与による糞便中LYCの増加は、食餌由来ではなく、生体内で普遍的におこることが確認された。その機序については大腸に存在する腸内細菌の関与が示唆された。これまでカロテノイドの吸収・代謝は、BC中央開裂酵素が多く存在する小腸上部さらに、吸収後の血液中への出現等に関心が向けられ、消化吸収の最終段階である大腸に関する研究はなされていなかった。しかし、本研究において糞便培養によりLYC量が増加したことは、腸内細菌によるカロテノイド生成あるいは、腸内細菌が生成する酵素によるBC環状構造開環の可能性が示唆された。さらに、スナネズミはヒトのカロテノイド吸収・代謝モデルとして有用であることが明らかとなり、RTを含めたカロテノイドの体内動態を包括的に検討することが可能となった。また、本研究において、BC及びLYC投与による肝臓RTの蓄積抑制や、BCとLYCの同時投与が、それぞれの肝臓蓄積を抑制したことは、カロテノイド受容体の存在を示唆し、それによりカロテノイドおよびRT蓄積量が制御されていると推測された。以上本研究は、今後のビタミンA及びカロテノイド代謝研究に対し重要な示唆を与え、栄養学の発展に寄与するものであると考える。

## 論文審査結果の要旨

本論文はカロテノイドの体内動態を明らかにすることを目的とし、 $\beta$ -カロテン（以下BC）投与による生体への影響を、リコペン（以下LYC）との関連に着目して検討したものである。BCは緑黄色野菜に多く含まれるオレンジ色の色素で、プロビタミンA活性がもっとも強く、抗酸化性を有することから、その重要性が古くより知られている。LYCはトマトや西瓜に含まれる赤色の色素で、プロビタミンA活性はないが、強力な抗酸化性を有し、がん細胞増殖抑制などの効果に対する期待が近年急速に高まっている。ともに日常摂取される食品に多く含まれていることから、摂食する成分の種類や量により、体内で相互に変換される、あるいは吸収・体内蓄積等に相互に影響する可能性があると考えられる。しかし、動物ではBCからLYCへの変換はないと言われているのみで、これを実証した研究はない。この理由の1つは、通常実験動物として用いられるラットとヒトとの違いにある。ラットにBCを与えると、BCはただちに開裂し、ビタミンA（レチノール、以下RT）になる。よってヒトのようにBCの形で吸収され、BCの形で体内に存在することはなく、このような実験には使用できないからである。また、ヒトはさまざまな腸内細菌を保持していることから、大腸における相互動態は他の動物とは異なる可能性もある。しかし、ヒトを用いた研究は血液に限定されており、消化・吸収・排泄までを含めた包括的研究はまったくなされていない。よってヒトそのものを用いての実証が必要である。本研究は、このような考えに基づいて計画され、実行されたものである。

序論において、このような本研究の背景および本論文の意義・目的が綿密な調査を基に論述されている。第1章においてはヒトを対象としてBC投与によるカロテノイドの体内動態について検討した。実施計画はいずれも本学倫理委員会の承認を得ている。実験1-1において、健常な成人女子7名に通常の食生活下でBC含有・リコペンフリーのニンジンジュースを飲用させ、その血清および糞便中のカロテノイドと、糞便中の細菌叢の分析を行った。この結果、リコペンを与えていないにも拘らず、血清および糞便中のリコペン含量が増加するという注目すべき結果を得た。そこで、さらに実験1-2において、特別に調製したリコペンフリー食で同様の実験を行い、同様の結果を得た。すなわち、ヒトにBCを与えることにより、体内でLYCが生成することを明らかにした。この結果は従来の定説を破る新知見である。そこでこの原因として2つの仮説を立てた。仮説①は、「腸内細菌あるいはそれらが産生する酵素によりBCがLYCに変化する。」、仮説②は、「BC摂取により体内環境が変化し、体内に貯留されていたLYCが排出する。」である。仮説①を検証するために実験1-3において、ヒト糞便の培養実験を行った。その結果、培養時間に伴ってLYCが増加する傾向を認めた。以上より、仮説①の可能性が示唆された。しかし、BCも増加傾向にあり、確証には至らなかった。

仮説を実証するためには、同位元素でラベルしたBCを用いる、あるいは胆汁酸を採取する必要がある、いずれもヒトの生命に関わる危険がある。よってヒトを用いてのこれ以上の研究は不可能であると判断し、ヒトに代わる実験動物を検索した。こうしてこの分野では全く使用されていないスナネズミを選び出した。

第2章、実験2-1では、BC投与によるBC、LYCおよびRTの変化を、スナネズミおよびラットの小腸を用いて検討し、スナネズミではヒトと同様、BCが小腸において吸収されることを明らかにした。また、実験2-2では両者の肝臓、血漿および糞便を用いて検討し、BC・LYCともにヒトと同様スナネ

ズミ中に貯留されること、および飼料由来でないLYCが生成することを認めた。これらの結果は、前章における仮説①を支持するとともに、スナネズミがヒトのカロテノイドの吸収モデルとして有用であることを意味する。さらにBCあるいはLYC投与により肝臓中のRTの貯留が抑制されるという興味深い事実を見出した。そこで、実験2-3において、カロテノイドの相互動態を包括的に検討した。その結果、LYC蓄積後にBCを与える事により、糞便中にLYCが排泄することが観察された。この結果は、仮説②の可能性を支持するものである。さらにBC・LYC同時投与により肝臓中のカロテノイドの取り込み量が減少することを明らかにした。この結果は、摂取量の変化による体内環境の変化が、各成分貯留量に大きく影響すること、すなわち、相互作用が顕著であることを示すものである。第3章において、本論文においてカロテノイドの総合動態に関して得られた成果を総括し、見出された新知見が生体内で普遍的に起こると結論している。

本論文は、摂取されたカロテノイドが体内において相互に影響し合い、消化・吸収・排泄の様相が変化することを初めて明らかにしたもので、学問的に極めて興味深い新知見を有する。また、クリアな結果が出にくいヒトを対象として実験を行った研究姿勢およびその成果は高く評価されるべきものである。さらに、この分野において全く使用されていなかったスナネズミを探し出し、カロテノイドの体内動態研究の実験モデルとして有用であることを初めて明らかにしたことは、この分野での今後の進歩に大きく貢献するものである。

以上により、本審査委員会は、申請者が課程博士の資格が充分にあると判断し、本論文が博士（学術）の学位を授与するにふさわしいと判断した。